

EFEKTIVITAS *Pseudomonas* sp. BOT4 DALAM MENDEGRADASI MINYAK JELANTAH MENGGUNAKAN SUMBER NITROGEN NATRIUM NITRAT DAN YEAST EXTRACT

Donatus Tia Harfan¹, Diah Wulandari Rousdy¹, Rikhsan Kurniatuhadi¹

¹Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Tanjungpura,
Jl. Prof. Dr. H. Hadari Nawawi, Pontianak
e-mail koresponden: donharfan@gmail.com

Abstract

Jelantah is the residual waste of cooking oil. The disposal of untreated waste directly into the environment has the potential to promote damage such as water channels clogging and water body pollution. Form of waste treatment such as biodegradation can be done using potential bacteria such as *Pseudomonas* spp. which has been known for being effectively in decomposing organic waste. This study aimed to observe the ability of *Pseudomonas* sp. BOT4 in degrading jelantah with different nitrogen sources i.e. NaNO₃ and yeast extract. This study was carried out from August to October 2018. The used cooking oil samples were homemade with deep frying method and the isolate samples were collected from used cooking oil-contaminated sewer water. Split plot design was used with time of incubation as main plots and nitrogen sources as subplots. The parameters observed were cell density and degraded oil weight. The results obtained stated that nitrogen sources of NaNO₃ and yeast extract given optimum effect on cell density of *Pseudomonas* sp. BOT4 on day three each with OD₆₀₀ value of 1,361 and 2,300. Nevertheless both nitrogen sources did not really give real effect on final weight of degraded oil, each with weight of 1,28 g dan 1,09 g.

Keywords: jelantah, *Pseudomonas* sp. BOT4, nitrogen sources, cell density, degraded oil weight

PENDAHULUAN

Minyak goreng merupakan salah satu kebutuhan pokok yang sering dikonsumsi oleh masyarakat, baik dalam skala rumah tangga maupun industri (Ramdja *et al.*, 2010). Sebagian besar minyak goreng yang beredar di Indonesia berasal dari minyak sawit mentah (*crude palm oil*/ CPO) dan minyak kelapa mentah (*crude coconut oil*/ CCO) (Daulay & Madya, 2015). Nilai konsumsi minyak goreng di Indonesia pada tahun 2014 sebesar 9,604 liter/kapita/tahun meningkat pada tahun 2015 menjadi 11,211 liter/kapita/tahun (Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian, 2015). Nilai ini diperkirakan akan terus meningkat setiap tahun seiring pertumbuhan penduduk dan industri perkebunan kelapa sawit di Indonesia. Peningkatan tersebut pada akhirnya akan berdampak pada peningkatan volume minyak jelantah sebagai limbah habis pakai.

Limbah minyak jelantah yang terbuang ke lingkungan perairan dapat menimbulkan pencemaran. Pencemaran terjadi akibat terbentuknya lapisan minyak di permukaan air sehingga menghambat kelarutan oksigen dalam air dan mengganggu organisme di dalam dan

sekitarnya. Oleh karena itu, diperlukan metode penanganan limbah minyak jelantah yang ramah lingkungan (Lessard & Le Bihan, 2003). Salah satu metode tersebut yaitu biodegradasi dengan bakteri potensial. Bakteri yang digunakan harus mempunyai fisiologi dan metabolik untuk mendegradasi bahan pencemar (Noegroho, 1999).

Bakteri *Pseudomonas* spp. yang termasuk ke dalam genus *Pseudomonas* diketahui mampu menggunakan substrat organik seperti minyak sayur untuk pertumbuhannya (Brenner *et al.*, 2005; Boulton & Ratledge, 1987). Salah satu anggota genus *Pseudomonas* yaitu *Pseudomonas aeruginosa* mampu menggunakan lebih dari 75 macam bahan organik sebagai sumber karbon baik melalui respirasi aerob maupun anaerob (Todar, 2004). Kemampuan *Pseudomonas aeruginosa* dalam aktivitas biodegradasi dipengaruhi nutrisi yang digunakan dalam medium pertumbuhannya seperti sumber nitrogen. Nitrogen bersifat krusial dalam produksi biosurfaktan yang berkaitan dengan sintesis protein dan enzim pertumbuhannya (Amaral *et al.*, 2008). Optimasi produksi dari biosurfaktan oleh *Pseudomonas aeruginosa* terjadi melalui mekanisme limitasi nitrogen dengan rasio karbon/

nitrogen (C/N) tertentu yang meningkatkan produksi biosurfaktan.

Nitrogen yang umum digunakan dalam produksi biosurfaktan oleh bakteri salah satunya *Pseudomonas aeruginosa* yaitu *yeast extract* (Amaral *et al.*, 2008). Biosurfaktan yang dihasilkan berfungsi untuk menurunkan tegangan permukaan minyak melalui proses pemecahan emulsi sehingga minyak dapat larut dalam air. Penelitian Wu *et al.* (2008) dan Moussa *et al.* (2014) menunjukkan pengaruh yang lebih signifikan dalam degradasi minyak bumi oleh *P. aeruginosa* ditunjukkan dari penggunaan natrium nitrat dibandingkan dengan amonium nitrat dan amonium sulfat sebagai sumber nitrogen anorganik. Hasil-hasil penelitian di atas menjadi dasar penelitian ini dilakukan dalam minyak jelantah untuk melihat efektivitas degradasi yang terjadi terutama dengan penggunaan natrium nitrat dan *yeast extract* sebagai sumber nitrogen oleh *Pseudomonas* sp. BOT4.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan dari Agustus hingga Oktober 2018 di Laboratorium Mikrobiologi dan di Laboratorium Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Tanjungpura Pontianak.

Bahan-bahan yang digunakan yaitu alkohol 70%, akuades, *dichloromethane* (DCM) teknis, isolat *Pseudomonas* sp. BOT4, media: agar DNase, Cetrimide, gelatinase, okidasi/fermentasi (O/F), lipolitik, *Tryptone Soya Agar* (TSA), metil merah, minyak jelantah, minyak zaitun steril, NaCl 0,85%, pepton, standar 0,5 McFarland, tween-80, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, agar, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, dan sumber nitrogen natrium nitrat (NaNO_3) dan *yeast extract*.

Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan dalam penelitian ini yaitu Rancangan Petak Terbagi (RPT). Penelitian dilakukan untuk melihat peran sumber nitrogen (NaNO_3 dan *yeast extract*) dan waktu inkubasi (hari ke-0, 1, 2, 3, 4) terhadap kepadatan sel bakteri *Pseudomonas* sp. BOT4 dan berat minyak terdegradasi.

Lima taraf lama inkubasi merupakan petak utama (*main plots*) dan tiga taraf perlakuan (termasuk kontrol/ tanpa sumber nitrogen) merupakan anak petak (*sub plots*) dan sehingga terdapat 15 kombinasi perlakuan yang diulang sebanyak tiga kali dan diperoleh 45 unit percobaan.

Pengambilan Sampel Isolasi *Pseudomonas* spp. dan Minyak Jelantah

Sampel untuk isolasi *Pseudomonas* sp. adalah air yang diambil dari parit tercemar minyak jelantah di dekat kios penjual ayam goreng tepi jalan. Sampel air diambil sebanyak 100 mL dan dimasukkan ke dalam botol kaca steril.

Sampel minyak jelantah dibuat di rumah menggunakan metode *deep frying* dengan tiga kali penggorengan dan diambil sebanyak 500 mL. Sampel disaring terlebih dahulu dari sisa-sisa penggorengan sebelum dimasukkan ke dalam botol kaca steril lalu disterilisasi.

Isolasi *Pseudomonas* spp.

Sampel air diencerkan pada lima laju pengenceran (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) lalu dituang ke dalam cawan Petri yang telah berisi medium TSA. Cawan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Setelah 24 jam, diambil masing-masing satu koloni yang tumbuh pada laju pengenceran 10^{-4} dan 10^{-5} untuk diidentifikasi menurut acuan oleh Lysenko (1961). Koloni yang teridentifikasi sebagai *Pseudomonas* spp. dikultur ke dalam medium selektif Cetrimide dan diinkubasi selama 2x24 jam. Koloni yang tumbuh lalu direkultur ke dalam medium TSA dan disimpan pada suhu 4 °C sebelum uji selanjutnya (Silva *et al.*, 2006).

Uji Gelatinase

Uji gelatinase dilakukan dengan menginokulasi bakteri ke dalam tabung reaksi yang berisi medium gelatin. Tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam sebelum dimasukkan ke dalam lemari es ($\pm 4^\circ\text{C}$) selama 10-15 menit. Reaksi positif ditunjukkan jika medium gelatin tetap mencair setelah dimasukkan ke dalam lemari es.

Uji Kualitatif Lipolitik *Pseudomonas* sp. BOT4

Uji kualitatif aktivitas lipolitik dimodifikasi dari metode Bestari & Suharjono (2015). Isolat dikultur terpisah selama 24 jam dalam tabung reaksi yang berisi 5 mL media preparasi cair yang dibuat dengan komposisi: 1% NaCl, 1% *yeast extract*, 2% pepton, 1% tween-80, dan 2% minyak zaitun steril.

Kertas cakram berdiameter ± 5 mm dicelupkan ke dalam media cair di atas selama 24 jam. Kemudian kertas diletakkan dalam cawan Petri yang telah berisi media uji padat yang dibuat dengan komposisi per liter: 10 g pepton, 5 g NaCl, 0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 g agar, 2,5% tween-80, 5% minyak zaitun steril, dan 0,01% metil merah. Cawan diinkubasi selama 2x24 jam lalu diukur indeks lipolitiknya dan isolat dengan indeks tertinggi dijadikan sebagai kultur inokulum dan diberi kode isolat BOT4.

Kultur Inokulum *Pseudomonas* sp. BOT4

Kultur inokulum dibuat dengan memasukkan satu loop kultur koloni *Pseudomonas* sp. BOT4 ke dalam tabung reaksi berisi 9 mL NaCl 0,85%. Tabung dikocok dan disetarakan kekeruhannya dengan larutan standar 0,5 McFarland.

Larutan standar 0,5 McFarland dibuat dalam tabung reaksi dengan mencampurkan 0,5 mL BaCl₂ 1% dan 9,5 mL H₂SO₄ 1% (Dalynn Biologicals, 2014).

Uji Degradasi Minyak Jelantah oleh *Pseudomonas* sp. BOT4

Uji degradasi dilakukan menurut metode oleh Subasioglu & Cansunar (2008) dalam medium basal (MB) dengan komposisi (g/L): KH₂PO₄ (0,7), Na₂HPO₄ (2), CaCl₂.2H₂O (0,01), MgSO₄.7H₂O (0,4), dan FeSO₄.7H₂O (0,001). Dua unit perlakuan sumber nitrogen: 0,25 gr NaNO₃ dan 0,25 gr yeast extract masing-masing dibuat di dalam 50 mL medium ditambah 2 mL inokulum bakteri dan 5 g minyak jelantah. Satu unit kontrol dibuat tanpa sumber nitrogen. Seluruhnya dibuat dalam labu Erlenmeyer untuk diinkubasi dalam shaker orbital dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 30 °C selama 4 hari. Pengulangan dilakukan tiga kali. Rasio karbon/nitrogen (C/N) yang digunakan 20:1.

Pengukuran Kepadatan Sel *Pseudomonas* sp. BOT4

Pengukuran absorbansi sel *Pseudomonas* sp. BOT4 dilakukan dengan mengamati nilai optical density (OD) tiap labu seluruh perlakuan pada panjang gelombang 600 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengukuran dilakukan setiap hari selama 4 hari berturut-turut dan hasilnya dibuat kurva (Mulligan & Gibbs, 1989).

Pengukuran Berat Minyak Jelantah Terdegradasi

Ekstraksi berdasarkan analisis gravimetri dengan mengukur residu minyak setiap unit perlakuan per hari selama empat hari berturut. Isi labu dituang ke dalam tabung sentrifus dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 50 menit. Hasil sentrifugasi ditambahkan 40 mL DCM dan diguncang dalam corong pemisah sehingga didapatkan lapisan organik pada bagian bawah corong. Lapisan dimasukkan ke dalam labu untuk dipanaskan dalam waterbath pada suhu 60 °C selama 5 hari untuk menguapkan DCM. Residu minyak yang tertinggal kemudian ditimbang dan dihitung selisihnya dengan berat labu awal (Bharathi et al., 2012).

Analisis Data

Data hasil pengukuran berupa kepadatan sel bakteri dan hasil degradasi minyak minyak jelantah ditabulasi dalam Microsoft Excel 2013. Selanjutnya data dianalisis dengan ANAVA univariat

menggunakan PASW Statistics 18 dan dilanjutkan dengan Uji Tukey dengan taraf signifikansi 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

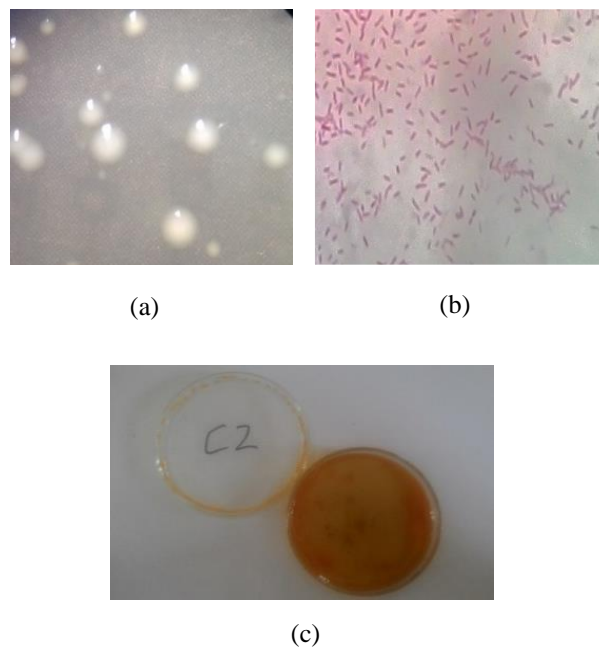
Isolasi *Pseudomonas* sp. BOT4

Pseudomonas sp. BOT4 yang diisolasi dari lingkungan tercemar minyak jelantah merupakan isolat yang memiliki aktivitas lipolitik terbesar. Berikut ini karakteristik isolat *Pseudomonas* sp. BOT4 yang diperoleh melalui beberapa uji determinasi berdasarkan Brenner et al. (2005).

Tabel 1. Karakteristik *Pseudomonas* sp. BOT4

Karakteristik	Hasil
Tumbuh di suhu 41 °C	+
Menghasilkan gelatinase	+
Lipolitik	+

Hasil pengamatan (Gambar 1) menunjukkan isolat memiliki ciri bulat, putih agak transparan, rata, dengan tepi agak tidak rata dan pusat yang agak mengerucut (a), Gram negatif dengan bentuk batang dan panjang 1-3 µm (b), dan memiliki indeks lipolitik 12,91 berdasarkan diameter zona bening yang terbentuk (c).



Gambar 1. Hasil Pengamatan *Pseudomonas* sp. BOT4 Morfologi Koloni (a), Morfologi Sel (perbesaran 1000x) (b), Uji Lipolitik (c)

Kepadatan Sel *Pseudomonas* sp. BOT4

Kepadatan sel digambarkan dalam OD (*optical density*) dalam panjang gelombang 600 nm (OD_{600}). Asumsi yang digunakan yaitu semakin tinggi nilai OD maka semakin tinggi kepadatan sel.

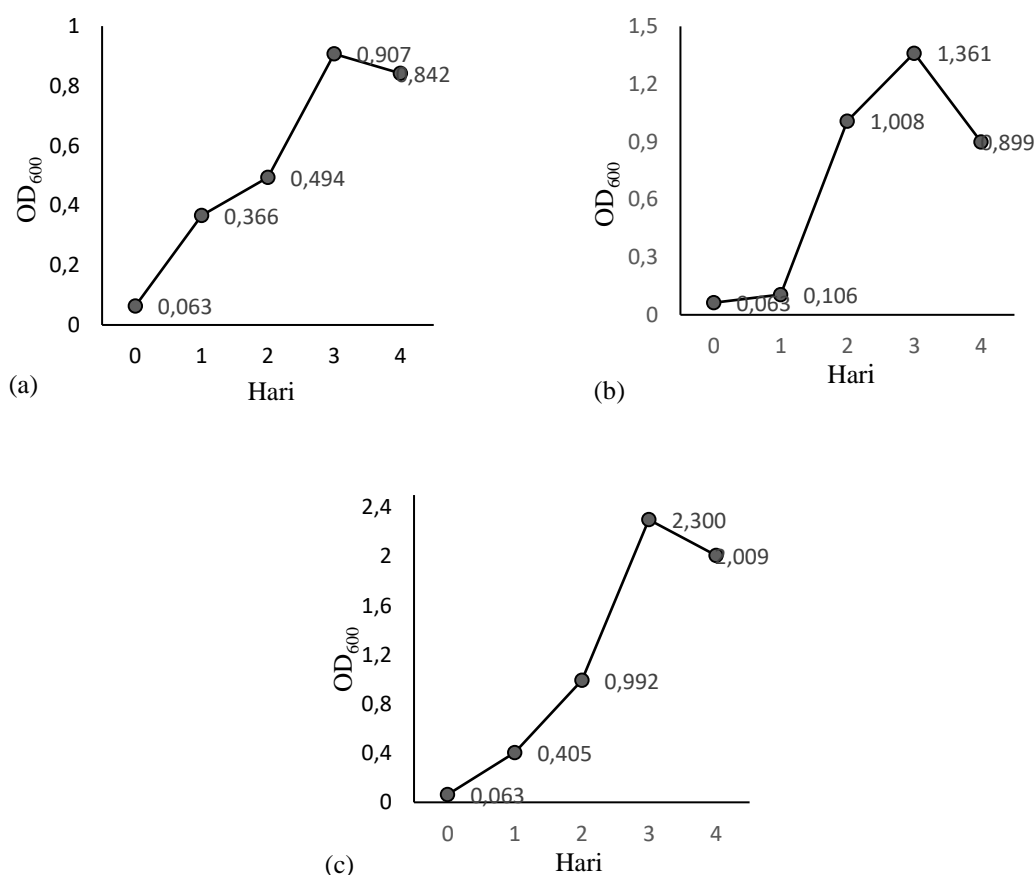
Pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa antara seluruh perlakuan relatif tidak terdapat perbedaan nyata pada hari pertama dan kedua pengukuran.

Akan tetapi pada hari ketiga dan keempat pengukuran antara perlakuan *yeast extract* dan dua perlakuan lain (kontrol dan $NaNO_3$) terdapat perbedaan nyata terutama pada hari ketiga saat penggunaan *yeast extract* menghasilkan nilai OD_{600} tertinggi. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan nitrogen terutama *yeast extract* berpengaruh signifikan terhadap peningkatan kepadatan sel dalam empat hari pengujian.

Tabel 2. Kepadatan Sel (OD_{600} Seluruh Perlakuan)

Perlakuan	Kepadatan Sel (OD_{600})			
	Waktu Inkubasi (hari)			
	1	2	3	4
Kontrol	0,365±0,198 ^a	0,493±0,257 ^{ab}	0,907±0,132 ^{abc}	0,842±0,009 ^{abc}
$NaNO_3$	0,105±0,681 ^a	1,008±0,669 ^{abc}	1,361±1,133 ^{abc}	0,899±1,353 ^{abc}
<i>Yeast extract</i>	0,404±0,223 ^a	0,992±0,664 ^{abc}	2,300±0,212 ^c	2,009±0,143 ^{bc}

Keterangan: Nilai yang diikuti pangkat sama menunjukkan tidak ada pengaruh nyata setelah dilanjutkan dengan Uji Tukey ($\alpha = 0,05$).



Gambar 2. Kurva Kepadatan Sel Tiap Perlakuan Kontrol (a), $NaNO_3$ (b), *Yeast extract* (c)

Gambar 2 menggambarkan kecenderungan peningkatan kepadatan sel bakteri dalam empat hari pengujian. Secara umum dapat dilihat bahwa pada setiap perlakuan terjadi peningkatan kepadatan sel secara linier mulai dari hari pertama sampai hari ketiga hingga terjadi penurunan pada hari keempat. Kepadatan sel meningkat secara bertahap dalam dua hari pertama pada seluruh perlakuan meskipun pada NaNO_3 terjadi peningkatan yang cukup lambat pada hari pertama yang diikuti peningkatan yang cukup

tinggi pada hari kedua. Seluruh perlakuan mengalami puncak peningkatan kepadatan sel pada hari ketiga dan menurun pada hari keempat.

Berat Minyak Jelantah Terdegradasi

Nilai residu minyak berbanding lurus dengan efektivitas perlakuan. Semakin banyak minyak yang terdegradasi maka semakin efektif perlakuan yang diberikan.

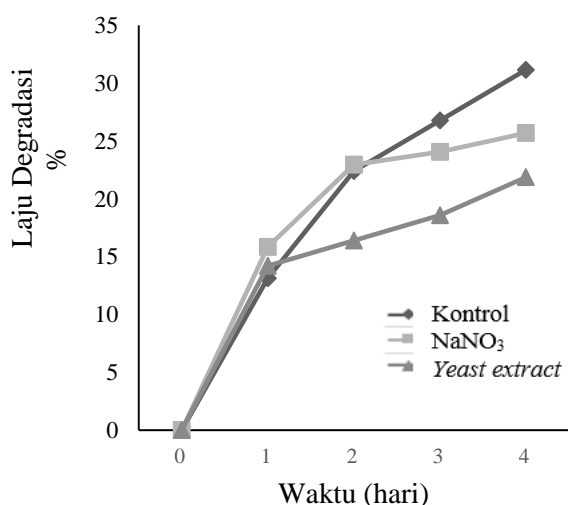
Tabel 3. Berat Minyak Jelantah Terdegradasi

Perlakuan	Berat Minyak Terdegradasi (g)			
	Waktu Inkubasi (hari)			
	1	2	3	4
Kontrol	0,66±0,85 ^a	1,15±0,14 ^{abcde}	1,34±0,13 ^{de}	1,56±0,17 ^e
NaNO_3	0,79±0,46 ^{abc}	1,15±0,08 ^{abcde}	1,20±0,09 ^{bcde}	1,28±0,09 ^{cde}
<i>Yeast extract</i>	0,71±0,25 ^{ab}	0,82±0,36 ^{abc}	0,93±0,31 ^{abcd}	1,09±0,25 ^{abcde}

Keterangan: Nilai yang diikuti pangkat sama menunjukkan tidak ada pengaruh nyata setelah dilanjutkan dengan Uji Tukey ($\alpha = 0,05$).

Tabel 3 secara umum menunjukkan relatif tidak ada pengaruh signifikan yang diberikan dari penggunaan sumber nitrogen (NaNO_3 dan *yeast extract*) dibandingkan tanpa penggunaan sumber nitrogen (kontrol) terhadap berat minyak terdegradasi. Hal tersebut ditunjukkan dengan berat minyak pada akhir pengamatan yang lebih baik dihasilkan pada perlakuan kontrol dibandingkan perlakuan NaNO_3 dan *yeast extract*. Adapun perlakuan *yeast extract* efektif hanya pada hari pertama.

Gambar 3 menyatakan bahwa laju degradasi seluruh perlakuan secara umum cenderung naik. Laju biodegradasi pada hari ke-1 relatif tidak berbeda jauh antar perlakuan dengan selisih 1-2% dengan laju tertinggi berada pada perlakuan NaNO_3 . Pada hari ke-2, laju perlakuan kontrol dan NaNO_3 meningkat 7-9% dengan NaNO_3 masih yang tertinggi sedangkan *yeast extract* naik sekitar 2%. Pada hari ke-3 dan 4 laju degradasi pada kontrol secara konsisten naik di kisaran 4% hingga mencapai 31,15%. NaNO_3 dan *yeast extract* hanya mengalami sedikit kenaikan dengan laju degradasi akhir masing-masing 25,68% dan 21,86%.



Gambar 3. Laju Degradasi Minyak Jelantah Seluruh Perlakuan (%)

Pembahasan

Isolasi *Pseudomonas* sp. BOT4

Anggota genus *Pseudomonas* terutama *Pseudomonas aeruginosa* telah lama diaplikasikan dalam biodegradasi karena dapat menghasilkan biosurfaktan menggunakan berbagai substrat untuk pertumbuhannya salah satunya minyak jelantah. Isolat *Pseudomonas* sp. BOT4 dalam penelitian ini diambil dari lingkungan tercemar minyak jelantah dengan asumsi isolat mampu menggunakan minyak sebagai substrat pertumbuhan dan bakteri tersebut dapat mendegradasi minyak.

Karakter isolat dideterminasi sesuai panduan Brenner *et al.*, (2005) setelah ditumbuhkan dalam medium Cetrimide sebagai medium selektif untuk *Pseudomonas* spp. Hasil determinasi menunjukkan beberapa karakteristik khusus yang dimiliki oleh *Pseudomonas* spp. (Tabel 1). Uji gelatinase

bertujuan untuk melihat kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim gelatinase yang mampu menghidrolisis gelatin (Priharta, 2008). Beberapa mikroorganisme dapat menguraikan molekul gelatin menjadi asam amino dan kemudian mampu menggunakannya sebagai sumber energi yang digunakan dalam metabolisme. Struktur utama gelatin adalah gel dan gelatin yang telah dimetabolisme sempurna oleh bakteri tidak berbentuk gel dan lebih bersifat cair (Lay, 1994).

Satu karakteristik dasar yang paling berhubungan dengan penelitian yaitu sifat lipolitik yang dimiliki isolat melalui uji lipolitik sebelum isolat dijadikan inokulum untuk uji degradasi minyak jelantah. Hasil uji lipolitik dilihat dari nilai indeks lipolitik yang dihitung berdasarkan perbandingan diameter kertas cakram dan zona bening yang terbentuk pada medium. Isolat dengan kode BOT4 diketahui memiliki nilai indeks lipolitik tertinggi dengan nilai 12,91. Mikroba seperti *Pseudomonas* yang telah diketahui mampu menghasilkan lipase diyakini juga mampu menghasilkan biosurfaktan karena proses sintesinya bekerja melalui mekanisme genetik yang sama (Heurlier *et al.*, 2004).

Kepadatan Sel *Pseudomonas* sp. BOT4

Hubungan antara kepadatan sel dan waktu pertumbuhan dinyatakan dalam kurva absorbansi (Gambar 2). Pada penelitian ini, kurva absorbansi *Pseudomonas* sp. BOT4 dalam tiap perlakuan diamati dengan mengukur nilai OD (*optical density*) atau laju kekeruhannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm setiap hari selama empat hari. Kepadatan sel berkaitan dengan pertumbuhan bakteri yaitu terjadinya penambahan kuantitas sel bakteri baik terutama dalam hal jumlah dan massa sel (Pelczar & Chan, 2005). Pertumbuhan dapat diamati dengan meningkatnya kepadatan atau kekeruhan kultur dalam rentang waktu tertentu dibandingkan kondisi awal. Rodrigues *et al.* (2006) menyatakan bahwa pertumbuhan sel dan akumulasi produk metabolit (termasuk biosurfaktan) dipengaruhi oleh komposisi media seperti sumber karbon, sumber nitrogen, faktor pertumbuhan dan garam-garam inorganik.

Inokulum yang digunakan dalam penelitian sebanyak 2 mL atau dengan rasio sekitar 3%. Hal ini dimaksudkan untuk menekan timbulnya efek penghambat pertumbuhan berupa media yang keruh akibat sel yang terlalu padat karena efek penghambat meningkat dengan meningkatnya rasio inokulum. Rasio inokulum yang rendah dapat memperpanjang fase pertumbuhan bakteri yang lambat, sementara rasio inokulum yang tinggi dapat

menyebabkan pembatasan zat gizi dan oksigen. Selain rasio inokulum juga diperhatikan mineral yang digunakan dalam medium. Penambahan unsur mineral dimaksudkan untuk menstimulasi akumulasi metabolit. Akan tetapi jika terdapat dalam konsentrasi tinggi mineral dapat menimbulkan efek penghambat yang terutama disebabkan oleh tekanan osmotik karena sel bakteri mengalami dehidrasi sehingga berakibat pada penghambatan pertumbuhan dan kematian sel (Zou *et al.*, 2014; Nichols *et al.*, 2000).

Kurva kepadatan sel seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2 menggambarkan pola secara umum kepadatan sel bakteri seluruh perlakuan yang cenderung meningkat pada hari pertama, kedua, dan ketiga dan menurun pada hari keempat. Kepadatan sel pada kontrol dan *yeast extract* meningkat bertahap pada hari pertama dan kedua sementara kepadatan meningkat lambat pada NaNO_3 pada hari pertama meski kemudian meningkat cukup signifikan pada hari kedua. Hal ini diduga dapat dikarenakan adaptasi sel bakteri pada NaNO_3 yang cukup lama pada hari pertama dibandingkan dengan Kontrol dan *yeast extract*. Kepadatan sel mencapai puncaknya pada hari ketiga saat seluruh sel aktif membelah. Pada hari keempat seluruh perlakuan mengalami penurunan kepadatan sel utamanya diduga dikarenakan penurunan kadar nutrisi dan penumpukan metabolit dalam medium yang dapat bersifat toksik. Penurunan ini juga dapat disebabkan oleh penurunan kadar oksigen untuk pertumbuhan karena *Pseudomonas* umumnya membutuhkan oksigen secara intensif (Panesar *et al.*, 2009).

Berdasarkan Gambar 2, dapat dilihat bahwa pada hari ke-3 seluruh perlakuan mengalami puncak kepadatan sel yaitu perlakuan *yeast extract* memiliki kepadatan tertinggi ($\text{OD}_{600}=2.300$) diikuti NaNO_3 ($\text{OD}_{600}=1.361$) dan Kontrol ($\text{OD}_{600}=0.907$). Hal ini didasarkan pada hasil penelitian oleh Qazi *et al.* (2013) yang menyatakan bahwa *yeast extract* meskipun termasuk sumber nitrogen organik tetapi *yeast extract* juga mengandung protein, karbohidrat, asam amino, dan nukleat. Oleh karena itu, *yeast extract* tidak hanya mengandung nitrogen tetapi juga karbon sehingga terdapat lebih banyak energi untuk pertumbuhan bakteri. Dengan demikian jumlah dan massa sel bakteri dalam kultur *yeast extract* lebih banyak dibanding dengan kultur lain.

Berat Minyak Jelantah Terdegradasi

Degradasi minyak jelantah ditunjukkan dengan adanya residu minyak jelantah sebagai penanda adanya penurunan kandungan minyak dalam medium setelah diberi perlakuan. Data selisih antara berat awal dan berat akhir minyak tiap perlakuan

dijadikan dasar untuk menentukan ada tidaknya pengaruh penambahan sumber nitrogen (NaNO_3 dan *yeast extract*) terhadap degradasi minyak.

Pada hasil dapat dilihat bahwa NaNO_3 efektif pada dua hari pertama dan perlakuan kontrol efektif pada dua hari terakhir dengan perbedaan persentase laju akhir yang cukup besar. Hal ini menunjukkan bahwa penambahan NaNO_3 hanya berpengaruh pada dua hari pertama degradasi dan cenderung stagnan pada dua hari berikutnya. Berbeda dengan kontrol yang tanpa penambahan nitrogen, meskipun lebih lambat pada awal degradasi tetapi tetap meningkat secara signifikan pada dua hari terakhir. Hal ini didukung oleh Syldatk *et al.* (1985) yang menyatakan bahwa limitasi nitrogen berperan penting pada peningkatan produksi biosurfaktan atau dalam kasus ini menunjukkan bahwa ketidaktersediaan nitrogen ternyata lebih cepat menginisiasi produksi biosurfaktan sehingga proses degradasi terjadi lebih efektif meski belum dapat dipastikan apakah mekanisme degradasi yang terjadi pada kontrol sama dengan mekanisme yang terjadi jika digunakan sumber nitrogen.

Sumber nitrogen NaNO_3 diketahui hanya mengandung nitrogen tanpa tambahan kandungan karbon. Setelah bakteri menggunakan sumber karbon dan sumber nitrogen untuk pertumbuhannya, bakteri langsung mulai membentuk rhamnolipid. Dengan demikian meski dalam perlakuan kepadatan yang dihasilkan lebih kecil tetapi aktivitas degradasi yang terjadi lebih efektif. Beberapa penelitian yang berfokus pada produksi biosurfaktan menyatakan bahwa nitrat merupakan sumber nitrogen terbaik untuk produksi biosurfaktan (Arino *et al.*, 1996; Robert *et al.*, 1991; Mulligan & Gibbs, 1989) tidak ditemukan dalam penelitian ini.

Berbeda dengan kontrol dan NaNO_3 , meski *yeast extract* menunjukkan kepadatan yang paling tinggi (Gambar 3), tetapi menunjukkan laju biodegradasi yang paling rendah yaitu nilai residu minyaknya paling sedikit dibandingkan perlakuan lain. Penggunaan sumber nitrogen organik salah satunya *yeast extract*, memang lebih memberikan pengaruh signifikan terhadap pertumbuhan sel dibanding pengaruh dalam produksi rhamnolipida (Moussa *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2006). Meski *yeast extract* merupakan sumber nitrogen yang paling sering digunakan untuk produksi biosurfaktan (Amaral *et al.*, 2008), penelitian Rashedi *et al.* (2006) malah menunjukkan penggunaan *yeast extract* tidak dianjurkan dalam produksi biosurfaktan. Hal ini terkait dengan sifatnya yang kompleks karena dapat berperan sebagai sumber karbon selain sumber

nitrogen sehingga menyebabkan penumpukan polisakarida meski nitrogen yang menipis. Qazi *et al.* (2013) menyatakan bahwa *yeast extract* yang mengandung gugus amina dapat memicu terjadinya sintesis biosurfaktan yang mengandung peptid (seperti lipopeptid) atau merangsang pertumbuhan enzim yang mengatur sintesis jenis biosurfaktan lainnya.

Biosurfaktan dapat diproduksi jika terjadi akumulasi lemak pada dinding sel bakteri. Bakteri akan mengakumulasi lebih banyak lemak jika terdapat sedikit nitrogen dalam media. Lemak merupakan hasil metabolisme lanjut dari karbohidrat yang terjadi karena kebutuhan nitrogen dalam sel dalam jumlah yang terbatas yang digunakan untuk sintesis protein seluler. Mikroba yang menghadapi kondisi pertumbuhan dengan kadar nitrogen terbatas melakukan konversi gliserol menjadi rhamnolipid (Nugroho, 2006). Faktor lainnya yang dapat mempengaruhi produksi biosurfaktan adalah jenis nutrisi, temperatur, pH, dan aerasi (Kosaric *et al.*, 1983).

Berdasarkan penjelasan di atas diperoleh kesimpulan penggunaan sumber nitrogen baik NaNO_3 maupun *yeast extract* kurang memberikan pengaruh yang signifikan dalam berat minyak jelantah terdegradasi yang dihasilkan meskipun lebih memberikan pengaruh yang signifikan (terutama sumber nitrogen *yeast extract*) terhadap kepadatan sel *Pseudomonas* sp. BOT 4.

DAFTAR PUSTAKA

- Amaral, PFF, Coelho, MAZ, Marrucho, IM, & Coutinho, JAP, 2008, 'Biosurfactants from Yeasts: Characteristics, Production and Application', *Biosurfactants, Landes Bioscience*, Dept. of Chemistry, University of Aveiro, Aveiro, Portugal
- Arino, S, Marchal, R, & Vandecasteele, JP, 1996, 'Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species,' *Appl. Microbiol. Biotechnology*, 45: 162-168
- Bestari, NC & Suharjono, 2015, 'Uji Kualitatif dan Kuantitatif Isolat Bakteri Lipolitik dari Limbah Cair Pabrik Pengolahan Ikan Kecamatan Muncar, Banyuwangi', *Jurnal Biotropika* 3 (3)
- Bharathi, P, Elavarasi, N, & Mohana Sundaram, S, 2012, 'Studies on Rate of Biodegradation of Vegetable (Coconut) Oil by Using *Pseudomonas aeruginosa*', *International Journal of Environmental Biology* 2 (1): 12-19

- Boulton, CA & Ratledge, C, 1987, 'Biosynthesis of Lipid Precursors to Surfactant Production', *Biosurfactants and Biotechnology* 47-87
- Brenner, DJ, Krieg, NR, Staley, JT, Garrity Sc.D, GM, Boone, DR, Vos, PD, Goodfellow, M, Rainey, FA, & Schleifer, KH, 2005, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*, ISBN 9780387280226, Springer US
- Dalynn Biologicals, 2014, 'McFarland Standard – for in vitro use only', *Catalogue No TM50-TM60*
- Daulay, SS & Madya, W, 2015, 'Pengembangan Minyak Kelapa', *Karya Tulis Ilmiah Hasil Survei*, Kementerian Perindustrian Republik Indonesia
- Heurlier, K, Williams, F, Heeb, S, Dormond, C, Pessi, G, Singer, D, Camara, M, Williams, P, & Haas, D, 2004, 'Positive Control of Swarming, Rhamnolipid Synthesis, and Lipase Production by the Posttranscriptional RsmA/RsmZ System in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1', *Journal of Bacteriology*, 186 (10): 2936-2945
- Kim, HS, Jeon, JW, Kim, BH, Ahn, CY, Oh, HM, & Yoon, BD, 2006, 'Extracellular Production of a Glycolipid Biosurfactant, Mannosylerythritol Lipid, by *Candida* sp. SY16 Using Fed-batch Fermentation', *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 70, 391
- Kosaric, N, Neil, CC, Gray, & Cairns, WL, 1983, 'Microbial emulsifiers and de-emulsifiers' dalam H.J. Rehm and G. Reed, *Biotechnology*, 3 Verlag Chemie.
- Lay B, 1994, *Analisis Mikrobial di Laboratorium*, PT. Grafindi Persada, Jakarta
- Lessard, P & Le Bihan, Y, 2003, *Introduction to Microbiological Wastewater Treatment, Fixed Film Processes, Handbook of Water and Wastewater Microbiology*, Ed Duncan Mara and Hogan Elsevier hal 317-336
- Lysenko, O, 1961, '*Pseudomonas* - An attempt at a general classification', *Microbiology* 25: 379-408
- Moussa, TAA, Mohamed, MS, & Samak, N, 2014, 'Production and Characterization of Di-Rhamnolipid Produced by *Pseudomonas aeruginosa* TMN,' *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31 (04): 867-880
- Mulligan, CN & Gibbs, BF, 1989, 'Correlation of Nitrogen Metabolism with Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa*', *Applied and Environmental Microbiology*, 55 (11): 3016-3019
- Nichols, DS, Olley, J, Garda, H, Brenner, RR, & McMeekin, TA, 2000, 'Effect of Temperature and Salinity Stress on Growth and Lipid Composition of *Shewanella gelidimarina*', *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (3): 2422-2429
- Noegroho, H, 1999, 'Pengaruh Aerasi pada Bioproses Limbah Kilang Minyak', *Lembaran Publikasi Lemigas* 2: 20-24
- Nugroho, A, 2006, 'Produksi Biosurfaktan oleh Bakteri Pengguna Hidrokarbon dengan Penambahan Variasi Sumber Karbon', *Biodiversitas*. 7 (4): 312-316
- Panesar, R, Panesar, PS, Hasija, D, Bera, M. B, & Kumar, H, 2009, 'Fermentative Potential of *Pseudomonas aeruginosa* Strain for Biosurfactant Production', *Biol. Forum. Inter. J.*, 1, 109
- Pelczar, M.J & Chan, ECS, 2005, *Dasar-dasar Mikrobiologi I*, Alih bahasa: Hadioetomo, RS, Imas, T, Tjitrosomo, SS dan Angka, SL, UI Press, Jakarta
- Priharta, AAYD, 2008, 'Isolasi dan Identifikasi Bakteri Endofit dalam Batang Tanaman *Artemisia annua* L. yang Diuji Potensi Antibakterianya terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Skripsi Universitas Sanata Darma Yogyakarta
- Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian, 2015, *Statistik Konsumsi Pangan 2015*, Diakses pada 03 November 2017 di <http://epublikasi.setjen.pertanian.go.id/epublikasi/StatistikPertanian/2015/STATISTIK%20KONSUMSI%20PANGAN%202015/files/assets/basichtml/page114.html>
- Qazi, MA, Malik, ZA, Qureshi, GD, Hameed, A, & Ahmed, S, 2013, 'Yeast Extract as the Most Preferable Substrate for Optimized Biosurfactant Production by rhlB Gene Positive *Pseudomonas putida* SOL-10 Isolate', *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 4 (7) ISSN: 2155-6199
- Ramdja, AF, Febrina, L, & Krisdianto, D, 2010, 'Pemurnian Minyak Jelantah Menggunakan Ampas Tebu sebagai Adsorben', *Jurnal Teknik Kimia Universitas Sriwijaya* 17: 7-14
- Rashedi, H, Jamshidi, E, Assadi, MM, & Bonakdarpour, B, 2006, 'Biosurfactant Production with Glucose as a Carbon Source', *Chem. Biochem. Eng Q*, 20 (1): 99-106

- Robert, M, Mercadé, ME, de Andrés, C, Espuny, M.J, Manresa, MA, & Guinea, J, 1991, 'Optimización de la producción de biotensoactivos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1', *Fasc.* 1, 42: 1-7
- Rodrigues, L, Teixeira, J, Oliveira, R, & van Der Mei, HC, 2006, 'Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria', *Process Biochemistry.* 41: 1–10
- Silva, RMP, Rodriguez, AA, de Oca, JMGM, & Moreno, DC, 2006, 'Biodegradation of Crude Oil by *Pseudomonas aeruginosa* AT18 Strain', *Tecnología Química* 26 (1): 70-77
- Subasioglu, T & Cansunar, E, 2008, 'Nutritional Factors Effecting Rhamnolipid Production by a Nosocomial *Pseudomonas aeruginosa*', *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry* 36 (1): 77-81
- Syldatk, C, Lang, S, Wagner, F, Wray, V, & Witte, L, 1985, 'Chemical and physical characterization of four interfacial-active rhamnolipids from *Pseudomonas* spec. DSM 2874 grown on n-alkanes', *Z. Naturforsch* 40 (1-2): 51-60
- Todar, K, 2004, *Todar's Online Textbook of Bacteriology: Pseudomonas aeruginosa*, Department of Bacteriology, Univ. of Wisconsin-Madison
- Wu, JY, Yeh, KL, Lu, WB, Lin, CL, & Chang, JS, 2008, 'Rhamnolipid Production with Indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 Isolated from Oil Contaminated Site', *Bioresour. Technol.*, 99, 1157
- Zou, CJ, M, Wang, Y, Xing, G, Lan, TT, Ge, X, Yan, & T, Gu, 2014, 'Characterization and Optimization of Biosurfactants Produced by *Acinetobacter baylyi* ZJ2 Isolated from Crude Oil-contaminated Soil Sample toward Microbial Enhanced Oil Recovery Applications', *Biochem. Eng. J.* 90 (10): 49-58